

сигнала полиаденилирования. В связи с этим, мы искусственно вводили в их хвостовую часть таких SINEs гексануклеотид AATAAA и терминатор транскрипции TTTTТ. Интересно, что транскрипты SINEs класса T–, измененные таким образом все равно не были способны к полиаденилированию. По-видимому, для полиаденилирования РНК, транскрибируемой РНК полимеразой III недостаточно наличия сигнала полиаденилирования. Очевидно, в ходе эволюции SINEs класса T+ приобрели какие-то дополнительные структурные особенности, которые необходимы для полиаденилирования их транскриптов. Используя конструкции SINEs B2 и Ere с протяженными делециями, мы обнаружили, что для полиаденилирования важен также небольшой фрагмент, расположенный непосредственно перед хвостовым участком. В других SINEs класса T+ роль такого фрагмента играют полипириимидиновые последовательности.

#### Библиографический список

1. Borodulina O.R., Kramerov D.A. Short Interspersed Elements (SINEs) from Insectivores. Two Classes of Mammalian SINEs Distinguished by A-rich Tail Structure// Mammalian Genome. 2001. № 12. С. 779-786.
2. Borodulina O.R., Kramerov D.A. Transcripts Synthesized by RNA Polymerase III Can Be Polyadenylated in AAUAAA-Dependent Manner // RNA. 2008. № 14. С. 1865-1873.

## СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ГЕРБИЦИДУ ГЛИФОСАТУ

**Н.Н. Гущинская, Е.А. Николайчик**

*Белорусский государственный университет, Минск. E-mail: guschinskayann@gmail.com*

Современное интенсивное сельское хозяйство невозможно без широкого применения гербицидов, однако их использование зачастую создает целый ряд экологических проблем, в первую очередь с токсичностью большинства гербицидов для животных (в том числе человека) и последующих посевов сельскохозяйственных культур. N-фосфометилглицин (глифосат) является фактически единственным из широко используемых в настоящее время гербицидов с низкой токсичностью для животных. Популярность глифосата обусловлена также дешевизной его производства и эффективным подавлением роста практически всех видов растений.

Механизм действия глифосата основан на специфическом и эффективном ингибировании 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS) – ключевого фермента биосинтеза ароматических соединений у бактериальных и растительных организмов. Низкая токсичность глифосата для животных ( $LD_{50}=5,6$  г/кг веса при внутреннем употреблении в

экспериментах на крысах (Giesy, 2000) обусловлена отсутствием у них пути биосинтеза ароматических соединений, ингибируемого этим гербицидом.

Тем не менее, существенный экономический эффект от применения глифосата возможен только при наличии устойчивых к этому гербициду сельскохозяйственных культур, что делает возможной их обработку (и полное подавление сорняков) в течение вегетации. Одним из вариантов создания трансгенных растений, устойчивых к глифосату, является введение в их геном гена *aroA* со сниженной чувствительностью к глифосату, продукт которого (EPSPS) является мишенью для данного гербицида, и последующая его модификация за счет сайт-направленного мутагенеза для снижения чувствительности к глифосату.

Анализ геномных последовательностей позволил разработать праймеры для амплификации *aroA* нескольких видов бактерий, имевшихся в коллекции кафедры молекулярной биологии: *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia amylovora*, а также *Escherichia coli*. Последующая амплификация и клонирование гена *aroA* позволили нам отобрать наиболее перспективные варианты генов *aroA* в отношении устойчивости их продуктов к ингибированию глифосатом. Два гена с наиболее выгодными характеристиками использовались нами для внесения аминокислотных замен с помощью сайт-направленного мутагенеза (Padgette, 1991). Уровень устойчивости к глифосату клеток бактериального штамма *E. coli* JM109, содержащих модифицированные гены *aroA*, оценивали с помощью чашечного микробиологического теста на минимальной глюкозо-солевой среде, содержащей различные концентрации пестицида.

Модифицированные гены были подвергнуты дополнительному раунду мутагенеза и рекомбинации *in vitro*, что позволило в конечном итоге отобрать варианты *aroA*, наличие которых в бактериальных клетках повышает устойчивость их к глифосату (МИК глифосата в 40 раз выше по сравнению с неизмененными генами). Наиболее устойчивыми оказались продукты генов *aroA* из *D. dadantii* с одиночной заменой и *E. coli* с двумя заменами. В дальнейшем планируется оценить эффективность работы полученных в настоящей работе мутантных генов в клетках растений.

#### Библиографический список

1. Giesy J.P., Dobson S., Solomon K.R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide // Rev. of Env. Cont. Tox. 2000. Vol. 167. P. 35-120.
2. Padgette S.R., Re D.B., Gasser C.S., Eichholtz D.A., Frazier R.B., Hironaka C.M., Levine E.B., Shah D.M., Fraley R.T., Kishore G.M. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 22364-22369.